

碱性木聚糖酶(BAX)检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TDX064-24 分光法 24 样)

有效期: 3 个月

测定意义

木聚糖酶(EC 3.2.1.8)主要由微生物产生,能催化水解木聚糖,也被称为戊聚糖酶或半纤维素酶,可分解酿造或饲料工业中的原料细胞壁以及 β -葡聚糖,降低酿造中物料的粘度,促进有效物质的释放,以及降低饲料中的非淀粉多糖,促进营养物质的吸收利用,因而广泛的应用于酿造和饲料工业中, BAX 一般分离自最适生长 pH 为 9-11 的微生物。

测定原理

BAX 在碱性环境中催化木聚糖降解成还原性寡糖和单糖,在沸水浴条件下进一步与 3,5-二硝基水杨酸发生显色反应,在 540nm 处有特征吸收峰,反应液颜色的深浅与酶解产生的还原糖量成正比,通过测定反应液在 540nm 吸光值增加速率,可计算 BAX 活力。

自备实验用品及仪器

天平、低温离心机、恒温水浴锅,可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制

缓冲液: 液体 65mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 液体 10mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂二: 液体 15mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

粗酶提取

1. 液体样本: 直接测定,若浑浊 8000g, 4℃, 离心 15min, 取上清, 作为待测样品。
2. 酶干粉: 称约 0.1mg, 加缓冲液 1mL, 震荡溶解待测。
3. 组织样本: 按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 缓冲液) 进行冰浴匀浆, 然后 8000g, 4℃, 离心 10min, 取上清待测。
4. 细菌或细胞的处理: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液充分匀浆以破碎并裂解细胞 (功率 20%, 超声 3S 秒, 间隔 10S, 重复 30 次); 8000g, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定操作表

	对照管	测定管
样品 (μ L)	200	200
缓冲液 (μ L)	300	300
试剂一 (μ L)		200
试剂二 (μ L)	300	
混匀, 盖紧瓶盖, 50℃ 水浴, 反应 30min, 立即沸水浴 10min 灭活。(注意不要让盖子爆开, 以免进水, 改变了反应体系)		
试剂一 (μ L)	200	
试剂二 (μ L)		300
混匀, 沸水浴显色 5min(注意不要让盖子爆开, 以免进水改变了反应体系), 1mL 玻璃比色皿, 540nm 处测定吸光值 A, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。		

BAX 计算公式

标准曲线: $y = 2.8432x - 0.0293$, $R^2 = 0.9985$

1. 按液体体积活力计算:

酶活定义: 50°C, pH9.0 条件下, 每毫升液体样本每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mL)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算:

酶活定义: 50°C, pH9.0 条件下, 每毫克蛋白每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按鲜重计算:

酶活定义: 50°C, pH9.0 条件下, 每克样本每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \div W \end{aligned}$$

4. 按细菌、细胞个数计算

酶活定义: 50°C, pH9.0 条件下, 每 1 万个细菌、细胞每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div 500 \\ &= 0.78 \times (\Delta A + 0.0293) \end{aligned}$$

150: 木糖的分子量; T: 反应时间, 30min; 稀释倍数=V 反总÷V 样=300μL÷60μL=5; 10⁶: 转化因子, 即 1mg/mL=10⁶ ng/mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

注意事项

1. 吸光度变化应该控制在 0.01~0.8 之间, 否则加大样品量或稀释样品, 注意计算公式中参与计算的稀释倍数要相应改变; 也可以延长或者缩短反应时间。
2. 试剂盒 2-8°C 保存, 保质期 3 个月, 建议尽快使用。